

COMPATIBILITÉ ET FERTILITÉ DE SOUCHES DE *MAGNAPORTHE GRISEA*, AGENT DE LA PYRICULARIOSE DU RIZ

D. SILUÉ, J.L. NOTTEGHEM

Laboratoire de Phytopathologie IRAT/DCV, B.P.
5035, 34032 Montpellier cedex 1, France.

RÉSUMÉ - Trois croisements fertiles et compatibles entre des souches de *Magnaporthe grisea* pathogènes pour le riz, ont été identifiés. Des croisements frères-soeurs et des croisements en retour ont été conduits. Nous avons évalué la fertilité des souches selon trois paramètres: l'aptitude des descendants à se croiser entre eux, l'évaluation du nombre de périthèces produits et le taux de germination des ascospores. Ces caractères sont indépendants. La production de périthèces et la germination des ascospores ont pu être améliorées. Nous avons également mis en évidence que l'isogénéisation était néfaste à la germination des ascospores.

ABSTRACT - Three compatible and fertile crosses between rice pathogenic strains of *Magnaporthe grisea* have been identified. Back-crosses and full-sib crosses were realized. Fertility of the strains was measured following three parameters: ability of progenies to intermate, perithecia production and germination ratio of ascospores. These three characters are independant. Perithecia production and germination of ascospores have been performed. We have also shown that isogenisation affected ascospores germination.

MOTS CLÉS : *Magnaporthe grisea*, pyriculariose du riz, fertilité, compatibilité.

INTRODUCTION

Magnaporthe grisea (Hebert) Barr (Barr, 1977), stade parfait de *Pyricularia oryzae* Cav. et de *P. grisea* (Cooke) Sacc., est un champignon parasite d'un grand nombre de Poacées (Asuyama, 1965). Deux espèces ont longtemps été distinguées en fonction de la spécificité parasitaire: *P. oryzae* l'un des principaux pathogènes du riz et *P. grisea* pathogène des autres Poacées.

Depuis que de nombreux travaux (Hebert, 1975; Yaegashi & Udagawa, 1978a,b; Yaegashi & Asaga, 1981; Kolmer & Ellingboe, 1988; Silué, 1986, 1990) ont fait apparaître que *P. oryzae* et *P. grisea* étaient intercroisables, l'idée de l'existence d'une seule espèce avec des formes spécialisées (Kolmer & Ellingboe, 1988) s'est renforcée. De plus, différents auteurs ont identifié des souches de *P. oryzae* attaquant d'autres Poacées (Kato, 1981; Singh &

Singh, 1988). De ce fait, une seule espèce, *M. grisea* (anamorphe *P. grisea*) est maintenant reconnue chez ce parasite (Rossman et al., 1990).

Depuis la découverte du stade parfait par Hebert (1971), la génétique de ce champignon a connu des progrès importants. Sa résistance aux fongicides a été étudiée (Taga et al., 1978, 1979, 1982). Il en est de même pour la spécificité d'hôtes qui peut être gérée par quelques gènes (Yaegashi, 1978; Yaegashi & Asaga, 1981; Valent & Chumley, 1987). Nous avons également identifié un mutant incapable de former des appressoria, caractère sous le contrôle d'un seul gène. L'hérédité de la pathogénie vis-à-vis du riz est cependant moins bien connue du fait de l'incompatibilité et du faible niveau de fertilité des souches. De plus, la plupart des souches pathogènes du riz se comportent comme des souches mâles (Itoi et al., 1980, 1983; Valent et al., 1986; Kolmer & Ellingboe, 1988) et très peu de souches pathogènes pour le riz et femelles fertiles ont été identifiées à ce jour.

Nous avons cependant identifié des croisements fertiles et compatibles entre des souches de *M. grisea* pathogènes du riz. Ces croisements ont été utilisés pour analyser l'avirulence vis-à-vis du riz (Silué, 1986, 1990). L'existence d'une relation de type gène-pour-gène entre *M. grisea* et *Oryza sativa* a pu être prouvée (Silué, 1990). Des cas qui pourraient être des exceptions à cette règle ont également été notés.

Pendant ces travaux, il a souvent été difficile de réussir certains croisements frères-soeurs de même que certains croisements en retour. La réussite de tels travaux reste conditionnée par l'amélioration de la fertilité. Aussi, nous sommes-nous proposés d'analyser l'incompatibilité et la fertilité des souches. Cette publication rassemble les résultats obtenus.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les souches de *M. grisea* utilisées

Pour déterminer les signes sexuels, 4 souches-testrices et femelles fertiles sont utilisées (KA 3, KA 7, KA 9 et Guy 11). KA 3 et KA 7 sont de signe Mat.1.1, KA 9 et Guy 11 sont de signe Mat.1.2. Les signes sexuels sont respectivement dénommés Mat.1.1 et Mat.1.2 d'après les recommandations de Yoder et al. (1986). Les caractéristiques de ces souches et de celles de CD 128, ML 25 et JA 4 ont été préalablement décrites (Silué, 1990). Guy 11 est femelle fertile tandis que CD 128, ML 25 et JA 4 sont mâles. Ces 3 souches ont été sélectionnées dans une collection de 110, pathogènes du riz et de signe Mat.1.1. Trente d'entre elles ont formé des périthèces avec Guy 11. Guy 11 x CD 128, Guy 11 x ML 25 et Guy 11 x JA 4 sont les 3 croisements produisant des ascospores ayant les plus forts taux de germination.

Réalisation des croisements de *M. grisea*

Les confrontations sont réalisées sur un milieu à base de farine de riz (Notteghem, 1981). La formation de périthèces ne peut avoir lieu que si l'on confronte 2 souches fertiles de signes de compatibilité sexuelle opposés. Pour déterminer ce signe, les 4 souches-testrices sont utilisées. Dans une première

boîte de Pétri, on place 4 implants, un par souche, sur deux diamètres perpendiculaires et à 1cm du centre. Sur l'un des diamètres, 2 des souches-testrices de même signe de compatibilité sexuelle sont ensemencées. Sur l'autre diamètre, on place 2 implants des souches à tester. La confrontation des souches à tester avec les souches-testrices de l'autre signe de compatibilité sexuelle est réalisée dans une seconde boîte de Pétri. Les boîtes de pétri sont ensuite scellées avec un film adhésif (Tesa 5280 BDF) et placées sous une lumière artificielle (tubes fluorescents) à 28°C. Après environ 4 jours, les boîtes de pétri sont placées à 20°C dans une salle éclairée de la même façon que précédemment avec une photopériode de 12h. Lorsque les souches sont fertiles et compatibles, on observe 15 jours environ après la réalisation de la confrontation, la formation de périthèces contenant des asques et des ascospores viables.

Isolements monoascospores

Quelques périthèces sont prélevés sous une loupe binoculaire (x 64) à l'aide d'un microscalpel et déposés sur l'eau gélosée (4,5% d'agar). Ils sont ensuite débarrassés du mycélium et des conidies dont ils sont recouverts. Avec la pointe du microscalpel, les périthèces sont ouverts et les asques sont étalés au moyen d'une fine tige de verre terminée par un renflement sphérique. Trente à soixante minutes après étalement, la lyse de la paroi des asques permet de disperser les ascospores. Après 5 à 6 h à 28°C, les ascospores viables ont germé; elles sont alors prélevées et mises en culture sur milieu farine de riz. On donne aux ascospores un numéro en trois parties. Le premier chiffre est le numéro du croisement, le deuxième le numéro de l'asque et le dernier celui de l'ascospore. Lorsque le taux de germination des ascospores est très bas (de l'ordre de 5%) il n'est pas possible d'isoler des tétrades. Nous avons alors isolé l'ensemble des ascospores sans tenir compte de leur asque d'origine. Le second chiffre du numéro qui leur est affecté est alors 0.

Stratégies de croisement

Pour l'amélioration de la fertilité, deux stratégies d'étude étaient possibles, bien que toutes deux limitées par la fertilité des descendants. La première stratégie est basée sur l'hypothèse que les gènes de fertilité sont apportés par Guy 11 et que le second parent moins fertile a des gènes défavorables. Dans ce cas, les croisements en retour par Guy 11 devraient améliorer la fertilité. La seconde hypothèse est que les deux souches parentales apportent l'une et l'autre des gènes de fertilité complémentaires. Selon cette hypothèse, quelques croisements entre descendants devraient être plus fertiles que le croisement initial. Pour tester ces deux hypothèses, des croisements en retour par chacun des deux parents ainsi que des croisements frères-soeurs ont été conduits et leurs descendances évaluées pour la fertilité.

Au cours de la réalisation du programme de croisement, il a été tenu compte simultanément de la fertilité des combinaisons et de l'avirulence des souches parentales, l'analyse de l'avirulence étant l'un des thèmes principaux du laboratoire.

RÉSULTATS

Croisements réalisés

Nous avons isolé 38 ascospores du croisement Guy 11 x ML 25, 23 du croisement Guy 11 x CD 128 et 58 du croisement Guy 11 x JA 4. Il a été possible d'obtenir des combinaisons fertiles et compatibles lorsque les descendants F1 issus des croisements respectifs étaient croisés avec Guy 11 ou avec JA 4. Par contre, tous les croisements en retour par les souches parentales CD 128 et ML 25 étaient stériles. Il a également été possible de réaliser un nombre variable de croisements frères-sœurs à partir des descendance F1 obtenues (Tab. 1). Ces travaux ont permis de mettre en évidence une

		* Mat.1.1	* Mat.1.2	■ ind	‡ ff**	total ***	fertiles**** (%)	
C ^e	Guy 11 X CD 128	10	12	■	54,5	120	16 (13%)	
	9/0/4 X Guy 11	28	23	1	81,4	100	19 (19%)	
B ^e	Guy 11 X JA 4	27	31	1	65,0	225	65 (29%)	
	6/0/13 X JA 4	22	24	0	47,8	528	7 (1,3%)	
A ^e	Guy 11 X ML 25	20	18	0	68,4	360	51 (14%)	
	1/0/2 X Guy 11	18	22	0	69,2	396	128 (33%)	
	2/0/3 X Guy 11	1°	4	4	■		16	14 (87%)
		2°	■	4	0		12	7 (58%)
		3°	4	4	0		16	10 (62%)
		4°	4	3	0	72#	12	12 (100%)
		5°	4	3	■		12	6 (50%)
		6°	4	4	0		16	8 (50%)
		7°	■	4	0		16	12 (75%)
		8°	4	4	■		16	7 (43%)
	27	22	0		116	76 (65%)		

■ : désignation de la famille de croisement

* = nombre total de sauches monospores de signe Mat.1.1, Mat.1.2.

ind. = signe sexuel indéterminé.

1° à 8° = numéros des tétrades isolées.

** = pourcentage de descendants femelles fertiles.

= pourcentage de descendants femelles fertiles pour l'ensemble des tétrades.

*** = nombre total de croisements réalisés.

**** = nombre de confrontations ayant donné lieu à ■ formation de périthèces.

Tableau 1: Pourcentage de confrontations compatibles entre descendants Mat.1.1 et Mat.1.2.

Table 1: Percentage of compatible matings between Mat.1.1 and Mat.1.2 progenies.

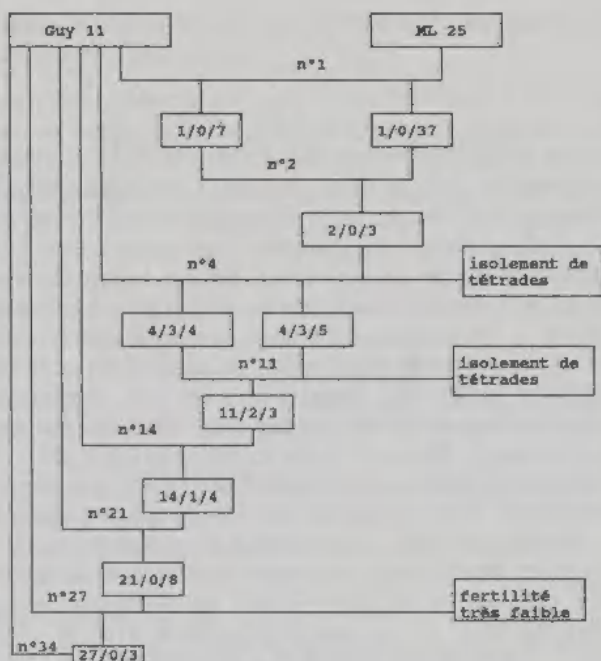


Figure 1: Croisements réalisés pour la mesure de la fertilité des souches de *M. grisea*.
 Figure 1: Crosses realized for fertility assessment of *M. grisea* strains.

disparité dans la fertilité des souches parentales (Tab. 1). Nous nous sommes donc proposés d'analyser plus en détail ce caractère. Ainsi, les croisements de la figure 1 et du tableau 1 ont été conduits et les ascospores de signe de compatibilité sexuelle Mat.1.1 confrontées à celles de signe Mat.1.2. Nous avons ensuite évalué la production de périthèces et la germination des ascospores.

Aptitude des souches à la reproduction sexuelle

Si le signe de compatibilité sexuelle contrôlé par un seul gène est facile à étudier, les autres caractères, dont le caractère femelle, liés à la fertilité sont plus complexes. L'aptitude d'une souche à porter des périthèces (souche femelle) formés lors de la confrontation avec une autre souche de signe de compatibilité sexuelle opposé, est facile à évaluer. Son expression est partiellement spécifique de la souche de signe opposé qui lui est confrontée et dans nos croisements, elle n'apparaît pas être sous contrôle génétique simple.

La réussite des croisements entre souches pathogènes pour le riz est limitée par le fait que la quasi totalité de ces souches se comportent comme des souches mâles (Itoi et al., 1980, 1983; Valent et al., 1986; Kolmer & Ellingboe, 1988). Par contre dans les descendance des trois croisements que nous avons réalisés avec la souche Guy 11, la proportion de souches femel-

les fertiles est relativement importante; elle est toujours supérieure à 45% (Tab. 1).

Lorsque l'on confronte entre eux les descendants des divers croisements, on peut faire l'observation suivante: les taux de confrontations compatibles dans le cas des croisements 9/0/4 x Guy 11 et Guy 11 x CD 128 sont respectivement de 19% et 13% (Tab. 1). Ces taux ne sont pas significativement différents. A l'inverse, les croisements Guy 11 x JA 4 et Guy 11 x ML 25 montrent des différences imputables aux parents récurrents. En effet, quand les ascospores du croisement Guy 11 x JA 4 sont croisées entre elles, on observe que 29% des confrontations sont fertiles. Le croisement en retour 6/0/13 x JA 4 ne fait apparaître en revanche que 1,3% de confrontations compatibles. Le même phénomène est observé en sens inverse avec le croisement Guy 11 x ML 25. Dans ce dernier cas, une augmentation du nombre des confrontations fertiles est observée avec les ascospores du croisement 1/0/2 x Guy 11. L'aptitude des souches CD 128, ML 25 et JA 4 à former des périthèces est donc différente (Tab. 1). De ces résultats, il ressort également l'influence plus ou moins grande du parent récurrent. Guy 11 améliore de façon sensible l'aptitude des descendants à former des périthèces. En effet, quand cette souche est croisée avec le descendant 1/0/2, le nombre de confrontations compatibles est multiplié par deux (33%). L'influence positive de Guy 11 est encore confirmée avec le croisement n° 4 (2/0/3 x Guy 11). Dans ce croisement il a été possible d'isoler des tétrades. De plus, quand les ascospores de chacune des tétrades sont croisées entre elles, le pourcentage de confrontations possibles est supérieur ou égal à 50% soit au moins trois fois la valeur obtenue avec le croisement initial (Tab. 1). La souche parentale JA 4 semble plutôt nuire à ce caractère (1,3% contre 29% dans le croisement initial).

Ces résultats nous ont conduit à évaluer l'apport maximal de Guy 11 pour la fertilité. Ainsi, nous avons réalisé des croisements frères-soeurs suivis de croisements en retour par Guy 11. Ensuite nous avons réalisé des croisements en retour successifs par la souche Guy 11. Le nombre de confrontations compatibles entre descendants a été évalué de même que la quantité de périthèces produits et le taux de germination des ascospores.

Production de périthèces et germination des ascospores

Au quatrième croisement en retour par la souche parentale Guy 11 (Fig. 1), nous avons augmenté la production de périthèces par un facteur 4 par rapport au croisement initial. Les gènes défavorables semblent avoir été contre-sélectionnés. Les descendants de ce croisement sont tous interfertiles et plus de 10 périthèces/cm² sont observés sur la zone de confrontation. Des résultats comparables sont observés avec les descendants du croisement n° 34 (Fig. 1). Cette augmentation de la production de périthèces n'est cependant pas accompagnée d'une augmentation du taux de germination des ascospores estimé par la possibilité d'isoler des tétrades. Seuls les croisements n° 4 et n° 11 ont un niveau de fertilité permettant l'isolement de tétrades. 10% des ascospores des croisements n° 2 et n° 14 germent alors que chez le croisement initial Guy 11 x ML 25, ce taux est de 5%. A partir du croisement n° 21, peu d'ascospores viables sont formées et leur pourcen-

tage de germination commence à diminuer. L'isogénisation semble donc diminuer la viabilité des ascospores.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Des deux hypothèses testées pour l'amélioration de la fertilité, l'une semble plus probable que l'autre. Les premiers croisements en retour par la souche Guy 11 augmentent légèrement la germination des ascospores mais celle-ci baisse au fur et à mesure de l'isogénisation. Celle-ci augmente cependant le nombre de croisements compatibles entre descendants. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Notteghem (non publiés) qui a croisé Guy 11 avec GA 1 (une souche pathogène du maïs). Après 7 croisements en retour par la souche Guy 11, peu d'ascospores viables sont formées. Cette diminution progressive de la germination des ascospores pourrait être attribuée au fait que les souches obtenues dans les dernières étapes de croisements sont génétiquement très proches du parent récurrent. Cependant, les croisements frères-sœurs suivis de croisements en retour par Guy 11 augmentent de façon sensible la germination des ascospores puisque cette stratégie permet l'isolement de tétrades.

La fertilité des souches de *M. grisea* apparaît comme un caractère complexe. Bien que les travaux réalisés ne permettent pas de tirer des conclusions définitives, ils confortent l'hypothèse de l'existence chez chacun des parents, de gènes complémentaires pour la fertilité.

Nelson (1959a,b) montre que chez *Cochliobolus heterostrophus* Drechsler (*Drechslera maydis* (Nisikado et Miyake) Subram et Jain), la compatibilité, la production de périthèces et la viabilité des ascospores sont des caractères sous contrôles génétiques indépendants. Ne sommes-nous pas dans une situation identique chez *M. grisea*? Bien que les résultats obtenus ne permettent pas de répondre avec certitude, ils confortent cette hypothèse. En effet, à partir du croisement n° 27 (Fig. 1), la production de périthèces est sensiblement améliorée mais le taux de germination des ascospores a considérablement chuté.

Les souches de *M. grisea* pathogènes du riz sont en général peu fertiles. Les croisements rapportés dans la littérature entre de telles souches riz restent limités à un petit nombre de combinaisons et impliquent souvent Guy 11 (Leung et al., 1988; Ellingboe et al., 1990). Guy 11 semble donc être une souche exceptionnelle. L'hypothèse la plus probable pour expliquer la rareté des croisements fertiles est que la plupart des souches pathogènes pour le riz ont accumulé plusieurs gènes défavorables à la reproduction sexuelle. D'ailleurs, le stade parfait de ce champignon n'a jamais été observé dans la nature et n'est vraisemblablement que très peu utile pour sa survie.

L'existence d'un petit nombre de croisements possibles entre souches pathogènes pour le riz, encourage à poursuivre la recherche d'autres souches fertiles et différentes de celles dont nous disposons pour certaines caractéristiques de la pathogénie. Ces souches permettront de développer la génétique de la pathogénie.

Remerciements: Ces travaux ont été financés par la communauté Economique Européenne (Projet Agriculture Tropicale) et le Centre international de la Recherche Agronomique pour le Développement Agricole (C.I.R.A.D.).

BIBLIOGRAPHIE

- ASUYAMA H., 1965 - Morphology, taxonomy, host range, and life cycle of *Pyricularia oryzae*. In: *The rice blast disease* (Proc. Symp. IRRI, July 1963). Baltimore, Maryland, Johns Hopkins Press: 9-22.
- BARR M.E., 1977 - *Magnaporthe*, *Telimenella* and *Hyponectria* (*Physosporrellaceae*). *Mycologia* 69: 952-956.
- ELLINGBOE A.H., WU B.C. and ROBERTSON W., 1990 - Inheritance of Avirulence/virulence in a cross of two isolates of *Magnaporthe grisea* pathogenic to rice. *Phytopathology* 80: 108-111.
- HEBERT T.T., 1971 - The perfect stage of *Pyricularia grisea*. *Phytopathology* 61: 83-87.
- HEBERT T.T., 1975 - Production of the perfect stage of *Pyricularia* from rice and other hosts. In: *Horizontal resistance to the blast disease of rice* (Proc. seminar C.I.A.T., 8-12 Oct. 1971). Cali, Colombia: 161-164.
- ITOI S., YAMAMOTO J., KARINO S., ARASE S. and KATO H., 1980 - Hermaphroditic isolates of *Pyricularia* isolated from ragi, *Eleusine corocana* (L.) Gaertner. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 46: 549-552.
- ITOI S., MISHIMA T., ARASE S. and NOZU M., 1983 - Mating behaviour of Japanese isolates of *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology* 73: 155-158.
- KATO H., 1981 - Responses of tropical and subtropical grasses to *Pyricularia* species from cereals and grasses. *Proc. Kanto Tosan Pl. Protect. Soc.* 27: 14-15.
- KOLMER J.A. and ELLINGBOE A.H., 1988 - Genetic relationships between fertility and pathogenicity and virulence to rice in *Magnaporthe grisea*. *Canad. J. Bot.* 66: 891-897.
- LEUNG H., BORRROMEO E.S., BERNADO M.A. and NOTTEGHEM J.L., 1988 - Genetic analysis of virulence in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Phytopathology* 78: 1227-1233.
- NELSON R.R., 1959a - Genetics of *Cochliobolus heterostrophus*. I. Variability in degree of compatibility. *Mycologia* 51: 18-23.
- NELSON R.R., 1959b - Genetics of *Cochliobolus heterostrophus*. IV. A mutant gene that prevents perithecial formation. *Phytopathology* 49: 384-386.
- NOTTEGHEM J.L., 1981 - Analyse des résultats d'inoculations de 67 variétés de riz par 15 souches de *Pyricularia oryzae*. In: Comptes rendus du "symposium sur la résistance du riz à la pyriculariose", IRAT-GERDAT Montpellier 18-21 mars 1981: 74-96.
- ROSSMAN A.Y., HOWARD R.J. and VALENT B., 1990 - *Pyricularia grisea*, the correct name for the rice blast disease fungus. *Mycologia* 82: 509-512.
- SILUÉ D., 1986 - Recherche de souches fertiles et compatibles de *Pyricularia oryzae* CAV, analyse de l'hérédité du pouvoir pathogène. D.E.A. de phytopathologie, Univ. Paris XI-Orsay, 12p.

- SILUÉ D., 1990 - Utilisation de la reproduction sexuée de *Magnaporthe grisea*, agent de la pyriculariose du riz pour l'étude des relations de virulence-résistance spécifique. Thèse doct., Univ. Paris XI, Centre d'Orsay, 156 p.
- SINGH H.I. and SINGH Kh.U., 1988 - Unrecorded weed host for *Pyricularia oryzae* in India. *Int. Rice Res. Newsletters* 13: 31-32.
- TAGA M., NAKAGAWA H., TSUDA M. and UHEYAMA A., 1978 - Ascospore analysis of Kasugamycin resistance in *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology* 68: 815-817.
- TAGA M., NAGAKAWA H., TSUDA M. and UHEYAMA A., 1979 - Identification of three different loci controlling Kasugamycin resistance in *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology* 69: 463-466.
- TAGA M., WAKAI T., TSUGA M. and UHEYAMA A., 1982 - Fungicid sensibility and genetics of IBP-resistant mutants of *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology* 72: 905-908.
- VALENT B., CRAWFORD M.S., WEAVER C.G. and CHUMLEY F.G., 1986 - Genetic studies of fertility and pathogenicity in *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia oryzae*). *Iowa State J. Res.* 60: 569-594.
- VALENT B. and CHUMLEY F.G., 1987 - Genetic analysis of host specificity in *Magnaporthe grisea*. *UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. (New Series)* 48: 83-93.
- YATEGASHI H., 1978 - Inheritance of pathogenicity in crosses of *Pyricularia* isolates from weeping lovegrass and finger millet. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 44: 626-632.
- YATEGASHI H. and UDAGAWA S., 1978a - The taxonomical identity of the perfect state of *Pyricularia grisea* and its allies. *Canad. J. Bot.* 56: 180-183.
- YATEGASHI H. and UDAGAWA S., 1978b - Additional note: The perfect state of *Pyricularia grisea* and its allies. *Canad. J. Bot.* 56: 2184.
- YATEGASHI H. and ASAGA K., 1981 - Further studies on the inheritance of pathogenicity in crosses of *Pyricularia oryzae* with *Pyricularia* sp. from finger millet. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 47: 677-679.
- YODER O.C., VALENT B. and CHUMLEY F.G., 1986 - Genetic nomenclature and practice for plant pathogenic fungi. *Phytopathology* 76: 383-385.